

# Biodegradable polymer conjugates for microencapsulating solid or dissolved substances in organic solvents or aqueous emulsions include an enzymatic cleavage site

**Publication number:** DE10008880 (A1)

**Publication date:** 2000-08-24

**Inventor(s):**

**Applicant(s):** BIOSERV AG [DE] +

**Classification:**

**- international:** A23L1/00; A23P1/04; A61K9/16; A61K9/50; B01J13/04; C08B37/00; C08G63/664; C08G63/91; C08G69/26; C08G69/48; C08L101/16; A23L1/00; A23P1/04; A61K9/16; A61K9/50; B01J13/04; C08B37/00; C08G63/00; C08G69/00; C08L101/00; (IPC1-7): A61K9/50; C08L101/00; C08L101/16; C08L29/00; C08L5/00; C08L67/00; C08L77/00; C08L89/00; C08L9/00

**- European:** A61K9/16H6D; A61K9/16H6D4; C08B37/00P4; C08G63/664; C08G69/26

**Application number:** DE20001008880 20000220

**Priority number(s):** DE20001008880 20000220; DE19991007227 19990219

## Also published as:

US2002147296 (A1)

RU2001125666 (A)

JP2002537415 (T)

EP1154760 (A1)

WO0048573 (A1)

[more >>](#)

## Abstract of DE 10008880 (A1)

Biodegradable polymer conjugates (I) for microencapsulating solid or dissolved substances in organic solvents or aqueous emulsions, and comprising an enzymatic cleavage site, are new. Biodegradable polymer conjugates (I) for microencapsulating solid or dissolved substances in organic solvents or aqueous emulsions, and comprising an enzymatic cleavage site, are new. R<1>n-P-(Q-P<2>)i-R<2>m (I) P<1>, P<2> = macromolecular structures; R<1>, R<2> = terminal groups, protecting groups, receptor molecules or labels; i, m, n = independently 0 or 1; and Q = an at least bifunctional structure with hydrophilic properties. An enzymatic cleavage site is present between the R and P substructures and/or within Q.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



⑯ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**  
  
**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑯ **Offenlegungsschrift  
DE 100 08 880 A 1**

⑯ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 08 L 101/00**  
 C 08 L 29/00  
 C 08 L 77/00  
 C 08 L 67/00  
 C 08 L 5/00  
 C 08 L 9/00  
 C 08 L 89/00  
 C 08 L 101/16  
 A 61 K 9/50

**DE 100 08 880 A 1**

⑯ Aktenzeichen: 100 08 880.5  
 ⑯ Anmeldetag: 20. 2. 2000  
 ⑯ Offenlegungstag: 24. 8. 2000

⑯ Innere Priorität:  
 199 07 227. 2 19. 02. 1999

⑯ Erfinder:  
 Erfinder wird später genannt werden

⑯ Anmelder:  
 Bioserv AG, 18059 Rostock, DE

⑯ Vertreter:  
 Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
 13125 Berlin

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑯ Bioabbaubare Komposite zur Herstellung von Mikrokapseln  
 ⑯ Die Erfindung betrifft abbaubare polymere Komposite zur Herstellung von Mikrokapseln beliebiger Inhaltsstoffe, wie z. B. Lebensmittel, Arzneimittel und Immunogene oder Materialien der Technik, wie z. B. Öle, Farbstoffe, Enzyme u. ä. Erfindungsgemäß haben sie eine polymere Zusammensetzung der allgemeinen Formel  

$$R^1_n-P^1-(Q-P^2)_i-R^2_m,$$
 wobei  $P^1$  und  $P^2$  für gleiche oder verschiedene makromolekulare Strukturen stehen,  $R^1$  und  $R^2$  gleiche oder verschiedene Endgruppen oder Schutzgruppen bzw. Rezeptormoleküle oder Marker bedeuten,  $i$ ,  $n$  und  $m$  aus dem Bereich der natürlichen Zahlen sind und im Einzelfall Null oder Eins annehmen können, und  $Q$  eine zumindest bifunktionelle Struktur mit hydrophilen Eigenschaften, abgeleitet aus den Bereichen der Polyole, Polyamide und Polyester, bedeutet, wobei die Zusammensetzung zur Spaltung der Bindungen zwischen den Substrukturen  $R$ ,  $P$  und/oder innerhalb  $Q$  eine enzymatische Erkennungs- und/oder Schnittstelle aufweist.

**DE 100 08 880 A 1**

# DE 100 08 880 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft bioabbaubare polymere Komposite zur Herstellung von Mikrokapseln beliebiger Inhaltsstoffe, wie z. B. Lebensmittel, Arzneimittel und Immunogene oder Materialien der Technik, wie z. B. Öle, Farbstoffe, Enzyme u. ä.

Die Umhüllung von flüssigen oder festen Substanzen zum Schutz vor äußeren Einflüssen und in Form kleiner Partikel oder Kapseln spielt für unterschiedliche Anwendungsgebiete zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie, Pharmazie und Technik eine große Rolle. Die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Mikropartikel werden bestimmt durch

- 10 – die Technologie der Herstellung (Sprühtrocknung, Koazervation, Extrusion, Verkapselung (Emulsions- und Dispersionsverfahren), Copolymerisation, Mikronisierung durch überkritische Gase)
- 15 – die eingesetzten Matrix-, Hüll-/Kapselmaterialien (Mono-, Di- und Polysaccharide, Proteine, Polyaminosäuren, Polycarbonsäuren, poly(lactid-co-glycolid), Acrylate, Polyalkohole und deren Copolymeren, Liposomen, Silikat u. a. in unterschiedlichen Kombinationen und Mischungsverhältnissen) und
- 15 – möglichen Oberflächenmodifikation (Immunglobuline, Lektine, poly(ethylenglycol), Gangliosid GM1, pharmakologisch wirksame Verbindungen)

Während die Technologien der Herstellung kleiner Kapseln oder Partikel Stand der Technik sind, wird für die ständig wachsenden Anwendungsfelder nach neuen Kapselmaterialien gesucht.

Insbesondere für die zielgerichtete Freisetzung von Arzneimitteln wird nach Lösungen gesucht, die den verkapselten Wirkstoff vor sicher äußeren Einflüssen schützt, als Transportvehikel in das vorgesehene Wirkungsgebiet fungiert und erst am Zielort den Wirkstoff freisetzt.

Aus US-A 5,700,486 sind bioabbaubare Polymere bzw. Copolymeren in pharmazeutischen Zusammensetzungen für die Bildung von Partikeln, die für die kontrollierte Freisetzung von pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, bekannt. Dabei stellen die aufgeführten Zusammensetzungen durchweg physikalische Mischungen der einheitlichen Polymeren und Copolymeren dar, deren anteilige Zusammensetzungen vor dem Verkapselungsprozeß variiert werden. Nachteil solcher bioabbaubaren Polymere ist, daß die Stofffreisetzung weder zielgerichtet noch durch definierte Enzymeinwirkung erfolgt.

US-A 5,686,113 beschreibt die Mikroverkapselung in wässrigen Lösungen. Das verwendete bioabbaubare Kapselmaterial ist ein Gemisch aus einem anionischen Polymer oder dessen Salzen und einem aminofunktionalisierten Monomer, wobei die Bildung des Reaktionsproduktes während der Mikroverkapselung erfolgt. Solche Gemische haben den Nachteil, daß die Bildungsreaktion von Mikrokapseln nicht gleichzeitig in wässrigen und auch in nicht wässrigen Systemen erfolgen kann. Mit den beschriebenen Oberflächenmodifikationen können die Partikel zwar selektiv an bestimmten Liganden binden, eine spezifische Auflösung der Kapselwand am Bindungsort ist jedoch nicht möglich.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, bioabbaubare Komponenten zu finden, die ein technisch einfaches Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln beliebiger Inhaltsstoffe gestatten und sowohl zum temporären Separieren von beliebigen Materialien, wie z. B. Öl, Farbstoffe, Enzyme, Arzneimittel, Immunogene, Nukleinsäuren usw. vom umgebenden Milieu, als auch oder für einen zielgerichteten Transport und steuerbare Freisetzung pharmazeutischer Wirkstoffe geeignet sind.

Überraschend ist als Kapselwandmaterial ein polymeres Komposit geeignet, das ein einheitliches Reaktionsprodukt darstellt und über kovalente Bindungen zwischen den Substrukturen verfügt, wobei mindestens eine der eingesetzten Komponenten hydrophile Eigenschaften besitzt. Dieses Komposit gestattet die Bildung von Mikrokapseln aus festen oder gelösten Stoffen oder Zubereitungen sowohl in wässrigen als auch nicht wässrigen Systemen.

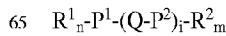
Die erfindungsgemäßen bioabbaubaren Polymere binden nur an definierten Liganden auch werden sie nur unter Einfluß bekannter Faktoren in Untereinheiten zerlegt. Die neuartigen Polymere sind für unterschiedliche Anwendungen verwendbar.

Es werden Kapselmaterialien hergestellt, die entsprechend dem Verwendungszweck spezifisch an Zielzellen binden, von diesen aufgenommen werden können bzw. sich auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren auflösen. Dieses Grundkonzept der chemischen Verbindung von nicht- bzw. schwerabbaubaren Substanzen mit Stoffen, die durch bestimmte Enzyme spezifisch gespalten werden (Komposite), kommt für die unterschiedlichsten biologischen und technischen Anwendungsbereiche zum Einsatz. Durch

- 55 – Einsatz dieser neuartigen Materialien
- Variationen in der Partikelgröße (nm -  $\mu$ m)
- mehrschichtiger Kapselwandgestaltung unter Verwendung unterschiedlicher Komposite und
- Anwenden unterschiedlicher Verfahren der Mikropartikel-Herstellung durch "core-shell-Verkapselung" bzw. Copolymerisation

60 werden somit neuartige Arzneimitteltransportsysteme geschaffen. Durch gezielte Oberflächenmodifikation und Auswahl von Schnittstellen, die nur durch definierte körpereigene oder Enzyme von Krankheitserregern gespalten werden, wurde es möglich, besonders hohe Wirkstoffkonzentrationen an Orten mit pathologischen Reaktionsmustern zu erreichen.

Bevorzugt werden Komposite der allgemeinen Formel



wobei

$P^1$  und  $P^2$  für gleiche oder verschiedene makromolekulare Strukturen, vorzugsweise aus den Bereichen Polyester, Poly-

# DE 100 08 880 A 1

amide oder Polysaccharide stehen,

R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleiche oder verschiedene Endgruppen oder Schutzgruppen bzw. Rezeptormoleküle oder Marker bedeuten, i, n und m aus dem Bereich der natürlichen Zahlen sind und im Einzelfall Null oder Eins annehmen können, Q eine zumindest bifunktionelle Struktur mit hydrophilen Eigenschaften, abgeleitet aus den Bereichen der Polyole, Polyamide und Polyester, bedeutet, als Kapselwandmaterial eingesetzt, die zur Spaltung der Bindungen zwischen den Substrukturen R, P und/oder sowie innerhalb Q eine enzymatische Erkennungs- und/oder Schnittstelle aufweisen.

Besonders bevorzugt werden für P<sup>1</sup> und P<sup>2</sup> Polymere mit Strukturelementen von Hydroxycarbonsäuren, deren Salze oder Ester eingesetzt. Vorzugsweise handelt es sich um Polyester, wie z. B. Polyglycolide, Polylactide, Poly(hydroxybuttersäuren) oder daraus resultierende Copolymeren, Polysaccharide, wie Polygalacturonsäure oder Alginsäure. Die End- oder Schutzgruppen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> sind Acyl-, Alkyl- oder Alkoxy carbonylgruppen. In einer anderen Ausführungsvariante stellen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> Marker, Rezeptor- oder anderweitig an Strukturen spezifisch bindende Moleküle dar, vorzugsweise aus den Stoffklassen der Oligopeptide, Proteine, Glykoproteine und Oligonukleotide. Rezeptormoleküle sind bevorzugt Lektine, Rezeptorliganden oder Antikörper.

Als Strukturelement Q sind insbesondere Verbindungen geeignet, die von Mono-, Oligo-, Polysacchariden abgeleitet sind und die gegebenenfalls über Amino- oder Carboxy-Gruppen verfügen, bzw. für Verbindungen, die von Di-, Oligo- oder Polypeptide abgeleitet sind. Bevorzugt besitzt das Strukturelement Q Enzymerkennungs- und -schnittstellen, vorzugsweise weist es ein Di- oder Polysaccharid auf, oder ein Oligopeptid mit definierter Proteaseschnittstelle.

Besonders bevorzugt werden Mischungen aus Kompositen als Verkapselungsmaterial eingesetzt, in denen i = Null oder i = 1 ist.

Gemäß der Erfindung werden mit dem erfindungsgemäßen Kompositmaterial Mikrokapseln von Stoffen, z. B. von Schadstoffen, wie Mineralöl, zum temporären Separieren vom umgebenden Milieu hergestellt.

Der Einsatz der erfindungsgemäßen Komposite mit unterschiedlichen Marker- oder Rezeptormolekülen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> hat den Vorteil, daß diese extra- und/oder intrazelluläre Strukturen erkennen. Durch den Einsatz der Komposite und durch die Anbindung eines Markers über die molekulare Erkennung kann ein zielgerichteter Transport und eine gezielte Wirkstofffreisetzung immunologisch und/oder pharmakologisch/toxisch wirksamer Substanzen am Wirkungsort erfolgen.

Die Herstellung von Mikrokapseln mit beliebigen Inhaltsstoffen, wie z. B. feste oder gelöste Materialien aus den Bereichen Lebensmittel, pharmazeutische Zubereitungen oder technische Produkte bzw. Zuschlagsstoffe unter Verwendung von den erfindungsgemäßen Kompositen erfolgt nach an sich bekannten Verfahren in organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Emulsionen, z. B. durch Core-Shell-Verfahren.

Bevorzugte Komposite können der folgenden Tabelle 1 entnommen werden.

## Abkürzungen

Ac-PLA 17000	O-Acetyl-polylactid 17000	35
Ac-PLA 2000	O-Acetyl-polylactid 2000	
BSA	Bovines Serumalbumin	
ClAc-PLA 2000	O-Chloracetyl-polylactid 2000	
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	40
DMAP	4-Dimethyl-aminopyridin	
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid	
Lektin	Lektin UEA I (Ulex Europaeus)	
MS-PLA 2000	O-Maleoyl-polylactid 2000	45
MES-Puffer	Morpholino-ethansulfonsäure	
PGAS	Polygalacturonsäure 25000–50000	
PLA 17000	Polylactid 17000	
PLA 2000	Polylactid 2000	
PGlu	Polyglutaminsäure 2000–15000	50

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1 : Erfindungsgemäße Komposite  $R_n^1 - P^1 - (Q - P^2)_i - R_m^2$  (Beispiele 1 – 11)

Bsp.-Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	P <sup>1</sup> ) <sup>1</sup>	P <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Q) <sup>1</sup>	n	i	m
1	OAc	OAc	PLA 2000	PLA 2000	Lys-Lys	1	1	1
2	OAc	OAc	PLA 2000	PLA 2000	His-His	1	1	1
3	COOH	COOH	PLA 17000	PLA 17000	PLA 17000	1	1	1
					H-Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala-OI <sup>1</sup>			
4	COOH	COOH	PGUS	PGUS	Lys-Lys	1	1	1
5	COOH	COOH	PGUS	PGUS	His-His	1	1	1
6	NH <sub>2</sub>	COOH	PGlu	PGlu	His-His	1	1	-
7	OAc	OAc	PLA 2000	PLA 2000	Lactose	1	1	1
8	OAc	OAc	PLA 17000	PLA 17000	Lactose	1	1	1
9	OH	OH	PLA 2000	PLA 2000	Dextran	1	1	1
10	Lektin) <sup>1</sup>	Lektin) <sup>1</sup>	MS-PLA 2000	-	-	1	0	1
11	BSA) <sup>1</sup>	BSA) <sup>1</sup>	MS-PLA 2000	-	-	1	0	1

<sup>1</sup> In den angegebenen Strukturelementen sind formal substituierte Wasserstoffatome bzw. terminale Gruppen nicht berücksichtigt.

<sup>2</sup> Die allgemeine Formel gibt nicht das Vorliegen möglicher Regiosomere wieder.

# DE 100 08 880 A 1

## Beispiel 1

### Komposit aus O-Acetyl-polylactid 2000 und Dilysin

Zu einer Lösung von Ac-PLA 2000 (1 g) in Acetonitril (40 ml) werden Lösungen von EDC (95.6 mg in 1 ml Wasser) und DMAP (122 mg in 2 ml Acetonitril) in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei RT im Ultraschallbad aktiviert. Zum aktivierte Gemisch wird eine Lösung von H-Lys-Lys-OH 2 · HCl (80.3 mg in 2 ml Wasser) gegeben und der gesamte Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum auf ca. 10 ml eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird zunächst mit 30 ml Ethanol/Wasser (v/v:50/50) gewaschen. Der gebildete Feststoff wird zentrifugiert (5000 U/min, 5 min), mit 20 ml Wasser gewaschen, nochmals zentrifugiert und im Vakuum getrocknet.

5

IR-Spektrum: 3342, 3335 (NH), 1759 (Ester), 1647 (Amid)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  = 1.44–1.61 (m, CH<sub>3</sub>), 2.58–3.27 (m, CH<sub>2</sub>), 5.08–5.15 (m, CH), 6.58–6.61 (m, NH), 8.15–8.17 (m, NH); <sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  = 14.6, 15.5, 16.5, 17.6, 20.4, 20.5 (CII<sub>3</sub>, PLA), 25.6, 34.9, 35.5, 36.7 (CII<sub>2</sub>), 39.5, 40.9, 43.1 (CII), 55.6 (CH<sub>2</sub>), 68.9 (CH, PLA), 106.5, 143.6 (CH), 169.5, 169.6, 169.8, 170.3 (CO, PLA), 175.0 (COOH, PLA), 175.8 (COOH)

10

15

## Beispiel 2

### Komposit aus O-Acetyl-polylactid 2000 und Dihistidin

Zu einer Lösung von Ac-PLA 2000 (1 g) in Acetonitril (40 ml) werden Lösungen von EDC (95.6 mg in 1 ml Wasser) und DMAP (122 mg in 2 ml Acetonitril) in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei RT im Ultraschallbad aktiviert. Zum aktivierte Gemisch wird eine Lösung von H-His-His-OH · Trifluoressigsäure (101.6 mg in 2 ml Wasser) gegeben und der gesamte Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum auf ca. 10 ml eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird zunächst mit 30 ml Ethanol/Wasser (50/50) gewaschen. Der gebildete Feststoff wird zentrifugiert (5000 U/min, 5 min), mit 20 ml Wasser gewaschen, nochmals zentrifugiert und im Vakuum getrocknet.

20

IR-Spektrum: 3504, 3496 (NH), 1759 (Ester), 1648 (Amid)

25

## Beispiel 3

### Komposit aus O-Chloracetyl-polylactid 17000 und einem cysteinreichen Peptid

Zu einer Lösung von ClAc-PLA 17000 (1.73 g in 50 ml Acetonitril) wird eine Lösung von H-Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala-OH · Trifluoressigsäure (25 mg in 1 ml Wasser) und DBU (20  $\mu$ l) gegeben und alles 3 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum auf ca. 10 ml eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird mit 40 ml Ethanol/Wasser (50/50) gewaschen und die Lösung vorsichtig abgegossen. Man wiederholt diese Prozedur mit 30 ml Ethanol und trocknet das Produkt im Vakuum.

35

Elementar-Analyse: ber.: N 0.19; gef.: N 0.25

IR-Spektrum: 3504 (NH), 1751 (Ester), 1648 (Amid)

40

## Beispiel 4

### Komposit aus Polygalacturonsäure und Dilysin

BrCN-Lösung (35  $\mu$ l, c = 0.1 g/l in Acetonitril) wird in 10 ml Wasser verdünnt und zu einer Lösung von Polygalacturonsäure (1.25 g) in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer (100 ml) getropft. Nach 15 min Röhren gibt man eine Lösung von H-Lys-Lys-OH · 2 HCl (5.335 mg) in Wasser (5 ml) hinzu und röhrt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Das Produkt wird mit Ethanol ausgefällt, zentrifugiert (4000 U/min, 5 min) und gefriergetrocknet.

45

IR-Spektrum: 3600–3100 (OH, NH), 1606 (bs sh, COOH, COO<sup>-</sup>, Amid), 1098 (C-O-C)

50

## Beispiel 5

### Komposit aus Polygalacturonsäure und Dihistidin

BrCN-Lösung (35  $\mu$ l, c = 0.1 g/l in Acetonitril) wird in 10 ml Wasser verdünnt und zu einer Lösung von Polygalacturonsäure (1.25 g) in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer (100 ml) getropft. Nach 15 min Röhren gibt man eine Lösung von H-His-His-OH · Trifluoressigsäure (6.24 mg) in Wasser (5 ml) hinzu und röhrt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Das Produkt wird mit Ethanol ausgefällt, zentrifugiert (4000 U/min, 5 min) und gefriergetrocknet.

55

IR-Spektrum: 3600–3100 (OH, NH), 1608 (bs sh, COOH, COO<sup>-</sup>, Amid), 1098 (C-O-C)

60

## Beispiel 6

### Komposit aus Polyglutaminsäure und Dihistidin

Polyglutaminsäure (100 mg) wird in Acetonitril (10 ml) suspendiert. Lösungen von EDC (2.24 mg in 1 ml Wasser) und DMAP (2.144 mg in 1 ml Acetonitril) werden in einer Portion zugegeben. Das Gemisch wird bei 30°C im Ultraschallbad 30 min aktiviert. Dazu gibt man eine Lösung von H-His-His-OH · Trifluoressigsäure (2.4 mg) in Wasser (1 ml)

65

# DE 100 08 880 A 1

und röhrt 2 h bei 50°C. Anschließend zentrifugiert (4000 U/min, 5 min) man den Feststoff ab, wäscht ihn mit 5 ml Ethanol/Wasser (50/50) und zentrifugiert erneut. Diese Prozedur wiederholt man mit 5 ml Wasser. Das Produkt wird dann gefriergetrocknet.

IR-Spektrum: 3342, 3287 (NII), 1733 (CO), 1645 (Amid)

5

## Beispiel 7

### Komposit aus O-Acetyl-polylactid 2000 und Lactose

10 Zu einer Lösung von Ac-PLA 2000 (10 g) in Acetonitril (150 ml) werden Lösungen von EDC (960 mg in 5 ml Wasser) und DMAP (610 mg in 10 ml Acetonitril) in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad aktiviert. Zum aktivierten Gemisch wird eine Lösung von Lactose (1.8 g in 25 ml Wasser) gegeben und 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum auf ca. 20 ml eingeengt. Der zurückbleibende Rest wird mit 100 ml Wasser gewaschen, zentrifugiert (3500 U/min, 10 min) und im Vakuum getrocknet.

15  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 1.13\text{--}1.35$  (m,  $\text{CH}_3$ ), 1.45–1.62 (m,  $\text{CH}_3$ , PLA), 2.10 (s,  $\text{CH}_3$ ), 2.57–2.71 (m, CH), 3.17 (s, CH), 4.30–4.37 (m, CH), 5.10–5.19 (CH, PLA);  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 14.6, 16.6, 16.7, 17.4, 20.5$  ( $\text{CH}_3$ ), 39.8, 42.77, 42.81, 43.0 (CH), 66.6, 68.2, 68.5, 68.7, 68.8, 68.9, 69.1, 69.4, (CH), 169.16, 169.2, 169.3, 169.6, 169.7, 170.3, 170.4 ( $\text{C=O}$ ), 175.2 (COOH)

20

## Beispiel 8

### Komposit aus O-Acetyl-polylactid 17000 und Lactose

25 Zu einer Lösung von Ac-PLA 17000 (8,5 g) in Acetonitril (100 ml) werden Lösungen von EDC (96 mg in 1 ml Wasser) und DMAP (61 mg in 1 ml Acetonitril) in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei RT im Ultraschallbad aktiviert. Zum aktivierten Gemisch wird eine Lösung von Lactose (90 mg in 5 ml Wasser) gegeben und 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum auf ca. 20 ml eingeengt. Der zurückbleibende Rest wird mit 100 ml Ethanol/Wasser (50/50) gewaschen und die Lösung vorsichtig abgegossen. Diese Prozedur wiederholt man mit 100 ml Ethanol/Wasser (50/50) und 50 ml Ethanol. Anschließend wird das Produkt im Vakuum getrocknet.

30  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 1.18\text{--}1.26$  (m,  $\text{CH}_3$ ), 1.41–1.56 (m,  $\text{CH}_3$ , PLA), 1.98 (s,  $\text{CH}_3$ ), 2.70 (s, CH), 3.12 (s, CH), 3.68 (dd, CH), 4.13–4.21 (m, CH), 4.29–4.37 (m, CH), 5.06–5.23 (CH, PLA);  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 14.0, 16.6, 16.7, 18.4, 20.5$  ( $\text{CH}_3$ ), 58.3, 61.5 ( $\text{CH}_2$ ), 66.57, 66.63, 68.9, 69.1, 69.2, 69.4 (CH), 169.1, 169.2, 169.3, 169.4, 169.5 ( $\text{C=O}$ )

MALDI-TOF-MS: bestätigt die Struktur AcO-PLA-Lactose-PLA-OAc

35

## Beispiel 9

### Komposit aus O-Acetyl-polylactid 2000 und Dextran 6000

40 Zu einer Lösung von Ac-PLA2000 (1 g) in Acetonitril (40 ml) werden Lösungen von EDC (95.6 mg in 1 ml Wasser) und DMAP (61 mg in 1 ml Acetonitril) in einer Portion zugegeben. Zu dem Gemisch wird eine Lösung von Dextran 6000 (3 g) in Wasser gegeben und der gesamte Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Dabei fällt ein weißer Niederschlag aus, der zentrifugiert (3000 U/min, 10 min) und mit 40 ml Wasser gewaschen wird. Anschließend wird wieder zentrifugiert und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

45  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 1.44, 1.46$  ( $\text{CH}_3$ , PLA), 3.04–3.71 (m, CH,  $\text{CH}_2$ , Dextran), 4.66 (bd), 5.15–5.22 (m, CH, PLA);  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 16.7$  ( $\text{CH}_3$ ), 66.2 ( $\text{CH}_2$ ), 68.9, 70.3, 70.6, 72.0, 72.7, 73.5, 98.4 (CH), 169.4 ( $\text{C=O}$ )

## Beispiel 10

### Komposit aus O-Maleoyl-polylactid 2000 und dem Lektin UEA I

50 MS-PLA2000 (0.736 mg) und EDC (0.269 mg) werden in 0.1 M MES-Puffer-Lösung (1 ml) suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad aktiviert. Das Lektin UEA I (10 mg) wird zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur 2 h geschüttelt. Anschließend wird der Feststoff zentrifugiert (3000 U/min, 10 min), zweimal mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

55

## Beispiel 11

### Komposit aus O-Maleoyl-polylactid 2000 und Albumin (BSA)

60 MS-PLA2000 (0.736 mg) und EDC (0.269 mg) werden in 0.1 M MES-Puffer-Lösung (1 ml) suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad aktiviert. BSA (20 mg) wird zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur 2 h geschüttelt. Anschließend wird der Feststoff zentrifugiert (3000 U/min, 10 min), zweimal mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

65

# DE 100 08 880 A 1

## Beispiel 12

### Mikroverkapselung einer Rabbit IgG-Zubereitung mit einem Komposit gemäß Beispiel 8

1 g einer lyophilisierten Rabbit IgG-Zubereitung (Korngröße 1 bis 5  $\mu\text{m}$ ) wird in 100 ml Petrolether (80–110°C) durch Rühren suspendiert. Dazu wird eine Lösung von 1 g Komposit aus Beispiel 8 und 5 ml Aceton in 10 Portionen innerhalb von 5 h zugetropft. Man läßt eine weitere Stunde röhren. Nach Sedimentieren wird die Suspension filtriert, mit 20 ml Petrolether gewaschen und luftgetrocknet. 5

Für eine vergleichende Betrachtung zur Wirkungsweise einer enzymatischen Schnittstelle wurden Polylactid 17000 und das entsprechende Kompositmaterial gemäß Beispiel 8 als Hüllmaterial eingesetzt und analog behandelt. 10

Die Freisetzungsuntersuchungen erfolgen im Inkubationsschüttler bei 37°C in PBS-Puffer bei pH 7,3. Es werden 200 mg Partikel in 10 ml PBS-Puffer suspendiert. Zur Untersuchung des Enzymeinflusses auf die Stabilität der Partikelhülle wird vor der Partikelzugabe  $\beta$ -Galaktosidase (20 units) zugesetzt. 500  $\mu\text{l}$  Lösung werden im Abstand von 30 min entnommen, bei 5000 l/min 5 min zentrifugiert und der Überstand auf den Gehalt an Rabbit IgG mittels LISA analysiert. 15

Die Ergebnisse sind in Abb. 1 und 2 zusammengefasst.

## Beispiel 13

### Mikroverkapselung von Albumin (BSA) mit einem Komposit gemäß Beispiel 7

1 g Komposit gemäß Beispiel 7 wird in 10 ml Methylenchlorid gelöst. Hierzu gibt man unter Dispergieren eine Lösung von 20 mg BSA in 500  $\mu\text{l}$  Wasser. Die Emulsion wird bei 500 l/min zu 300 ml einer 1%igen Polyvinylalkohollösung getropft. Man läßt 30 min nachröhren, zentrifugiert 5 min bei 1800 l/min. Die überstehende Lösung wird abgetrennt. Die Partikel werden mit wenig Wasser resuspendiert, nochmals zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. 20

25

## Beispiel 14

### Mikroverkapselung von Albumin (BSA) mit einem Komposit gemäß Beispiel 7 mittels Sprühgetrocknung

30

400 mg BSA werden in 200 ml Wasser gelöst. Darin wird eine Lösung von 20 g Komposit gemäß Beispiel 7 in 100 ml Methylenchlorid so dispergiert, dass das Methylenchlorid nahezu vollständig verdampft und eine stabile Emulsion entsteht. Diese Emulsion wird anschließend sprühgetrocknet.

Gerätebedingungen: Einlasstemperatur 93°C, Auslasstemperatur 63–66°C, Aspirator: 98%, Pumpe: 10% 35

35

## Beispiel 15

### Core-Shell-Verkapselung von Rabbit IgG/PLA 17000-Kernen mit Kompositen gemäß Beispiel 10

40

1 g Rabbit IgG/PLA 17000-Kerne (hergestellt in Analogie zu Beispiel 12,  $d = 1$ –10  $\mu\text{m}$ ) werden in 50 ml Petrolether (80–110°C) unter Rühren resuspendiert. Dazu wird eine Lösung von 0,05 g Komposit gemäß Beispiel 10 und 0,05 g PLA 17000 in 2 ml Aceton zugetropft. Man läßt eine weitere Stunde röhren. Nach Sedimentieren wird die Suspension filtriert, mit 20 ml Petrolether gewaschen und luftgetrocknet.

Die resuspendierten Partikel agglutinieren mit Anti-Ulex-beschichteten, fluoreszenten Silikatpartikeln ( $d = 800$  nm) quantitativ. 45

45

## Beispiel 16

### Mikroverkapselung von Silikatpartikeln (mit Amaranth imprägniert) mit einem Komposit gemäß Beispiel 7

50

Als Kernmaterial werden synthetische Silikatpartikel ( $d = 800$  nm) verwendet. 2 g Silikatpartikel werden in einer wäßrigen Amaranthlösung (50 mg/50 ml Wasser) 10 min geschüttelt, zentrifugiert und getrocknet. 1 g dieser Partikel werden in 100 ml Petrolether (80–110°C) suspendiert. Dazu wird eine Lösung von 1 g Komposit aus Beispiel 7 und 5 ml Aceton in 10 Portionen innerhalb von 5 h zugetropft. Man läßt eine weitere Stunde röhren. Nach Sedimentieren wird die Suspension filtriert, mit 20 ml Petrolether gewaschen und luftgetrocknet. 55

Die Freisetzungsuntersuchungen erfolgen im Inkubationsschüttler bei 37°C in PBS-Puffer bei pH 7,3. Es werden 200 mg Partikel in 10 ml PBS-Puffer suspendiert. Zur Untersuchung des Enzymeinflusses auf die Stabilität der Partikelhülle wird vor der Partikelzugabe  $\beta$ -Galaktosidase (20 units) zugesetzt. 500  $\mu\text{l}$  Lösung werden im Abstand von 30 min entnommen und spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm auf den Gehalt an Amaranth analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3 zusammengefasst. 60

60

## Patentansprüche

1. Bioabbaubare polymere Komposite zur Herstellung von Mikrokapseln aus festen oder gelösten Stoffen oder Zubereitungen in organischen Lösungsmitteln oder wäßrigen Emulsionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine polymere Zusammensetzung der allgemeinen Formel 65

$R_1^n-P^1-(Q-P^2)_i-R^2_m$  haben,

# DE 100 08 880 A 1

wobei P<sup>1</sup> und P<sup>2</sup> für gleiche oder verschiedene makromolekulare Strukturen stehen, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleiche oder verschiedene Endgruppen oder Schutzgruppen bzw. Rezeptormoleküle oder Marker bedeuten,

5 i, n und m aus dem Bereich der natürlichen Zahlen sind und im Einzelfall Null oder Eins annehmen können, und Q eine zumindest bifunktionelle Struktur mit hydrophilen Eigenschaften, abgesehen aus den Bereichen der Polyole, Polyamide und Polyester, bedeutet, wobei die Zusammensetzung zur Spaltung der Bindungen zwischen den Substrukturen R, P und/oder innerhalb Q eine enzymatische Erkennungs- und/oder Schnittstelle aufweist.

10 2. Komposite nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß P<sup>1</sup> und P<sup>2</sup> Polymere mit Strukturelementen aus den Bereichen Polyester, Polyamide/-amine oder Polysaccharide bzw. von Hydroxycarbonsäuren, deren Salzen oder Estern sind.

15 3. Komposite nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Polyester Polyglycolide, Polylactide, Poly(hydroxybuttersäuren) oder daraus resultierende Copolymeren sind.

4. Komposite nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Polysaccharide Polygalacturonsäure oder Alginsäure sind.

5. Komposite nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die End- oder Schutzgruppen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> Acyl-, Alkyl- oder Alkoxy carbonylgruppen sind.

20 6. Komposite nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> Marker, Rezeptor- oder anderweitig an Strukturen spezifisch bindende Moleküle darstellen, vorzugsweise aus den Stoffklassen der Oligopeptide, Proteine, Glykoproteine und Oligonukleotide.

7. Komposite nach Anspruch 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturelement Q für eine Verbindung steht, die sich von Mono-, Oligo- oder Polysacchariden ableitet, die gegebenenfalls über Amino- oder Carboxy-Gruppen verfügen, oder daß Q für eine Verbindung steht, die sich von Di-, Oligo- oder Polypeptiden ableitet.

25 8. Komposite nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturelement Q ein Molekül ist, das durch Enzyme gespalten werden kann.

9. Komposite nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturelement Q ein Di- oder Polysaccharid aufweist.

10. Komposite nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturelement Q ein Oligopeptid mit definierter Proteaseschnittstelle aufweist.

30 11. Komposite nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen der allgemeinen Formel eingesetzt werden, in denen i = Null oder i = 1 ist.

12. Verwendung von polymerem Kompositmaterial nach Anspruch 1 bis 11 zum temporären Separieren von Stoffen aus dem umgebenden Milieu.

35 13. Verwendung nach Anspruch 12 in mehreren Hüllen mit unterschiedlichen Enzymerkennungs- und -schnittstellen.

14. Verwendung nach Anspruch 12 und 13 mit unterschiedlichen Marker- oder Rezeptormolekülen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup>.

15. Verwendung nach Anspruch 14 mit unterschiedlichen Marker- oder Rezeptormolekülen R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup>, die extra- und/oder intrazelluläre Strukturen erkennen.

40 16. Verwendung von Kompositen nach 12 bis 15 für den zielgerichteten Transport und die Freisetzung von immunologisch und/oder pharmakologisch/toxisch wirksamen Substanzen.

17. Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln aus festen oder gelösten Stoffen oder Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß man Komposite gemäß der Ansprüche 1 bis 11 in organischen Lösungsmitteln löst oder wäßrige Emulsionen davon herstellt und die Verkapselung nach an sich bekannten Techniken erfolgt.

45 Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

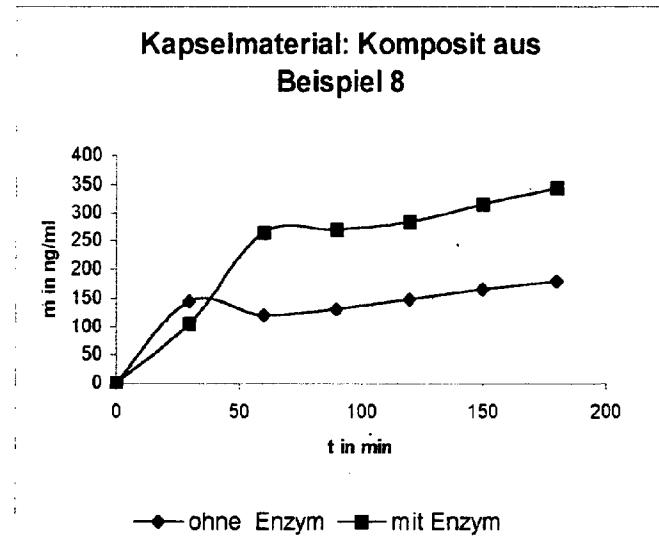


Abb.1 : Rabbit IgG-Release aus Mikrokapseln gemäß Beispiel 12  
mit bzw. ohne Zusatz von Enzym ( $\beta$ -Galaktosidase)

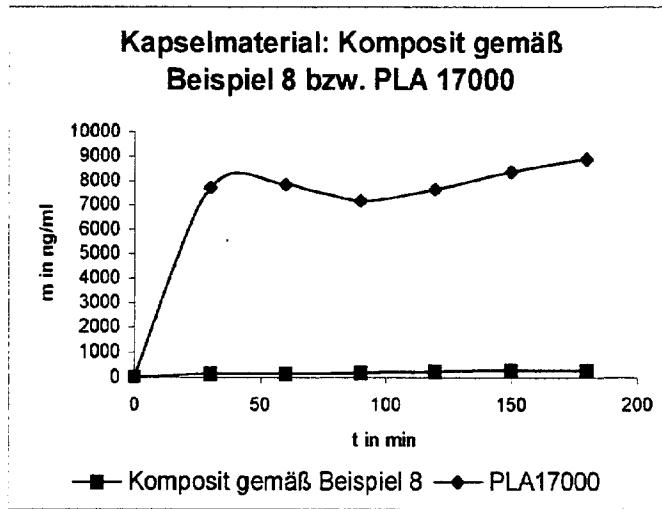


Abb. 2 : Rabbit IgG-Release aus Mikrokapseln gemäß Beispiel 12  
im Vergleich zu analogen Mikrokapseln aus PLA 17000

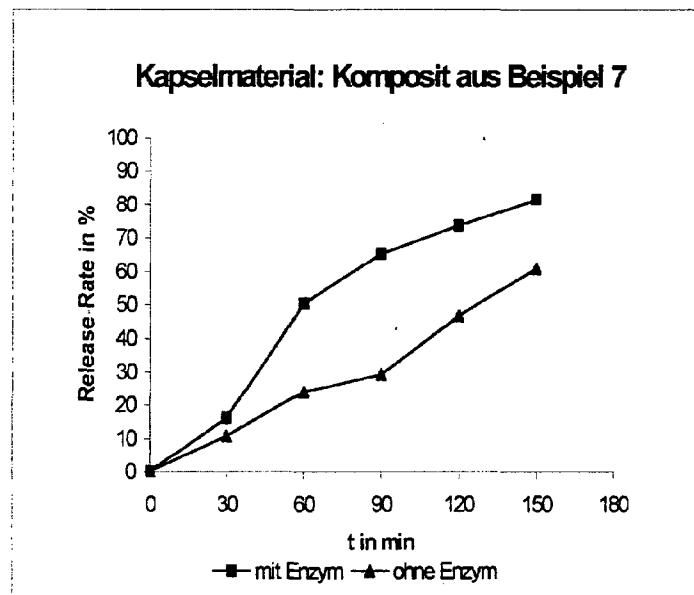


Abb. 3: Amaranth-Release aus Mikrokapseln gemäß Beispiel 16  
mit bzw. ohne Zusatz von Enzym ( $\beta$ -Galaktosidase)